

拟除虫菊酯对家蝇 Na-K-ATPase 抑制作用的研究*

何运转** 李梅 冯国蕾 王荫长**

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 通过对家蝇神经系统 Na-K-ATPase 性质的研究, 表明 Na-K-ATPase 反应的适宜 pH 值为 7.0~8.0, 适温为 35~40℃, K_m 为 0.22 mmol/L, V_{max} 为 555.56 nmol/(mg·min)。比较测定了家蝇敏感品系、Del-R、2Cl-R 抗性品系的 Na-K-ATPase 活性及溴氰菊酯和氯菊酯对该酶的抑制作用。实验证明, 敏感与抗性品系间 Na-K-ATPase 活力无显著的差异, 但溴氰菊酯和氯菊酯对不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的抑制作用有明显区别, 两种拟除虫菊酯可抑制敏感家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性, 而对抗性品系无明显的抑制作用。

关键词 Na-K-ATPase, 家蝇, 拟除虫菊酯

Na-K-ATPase 广泛分布于各类细胞质膜上, 在可兴奋细胞如神经突触质膜上含量尤为丰富^[1]。Na-K-ATPase 的基本功能是催化 ATP 末端磷酸水解, 并利用该反应产生的自由能来逆电化学梯度, 进行 Na^+ 、 K^+ 的主动运输, 从而维持细胞膜内外 Na^+ 、 K^+ 离子浓度的相对恒定及渗透压的平衡, 以保证细胞正常的神经传导或物质吸收等重要的生理功能^[2,3]。近代杀虫剂分子毒理学研究发现, 拟除虫菊酯类杀虫剂的毒理机制与昆虫神经系统中 Na-K-ATPase 有着密切的关系^[4], 而对 Na-K-ATPase 与抗性间的关系, 目前研究的甚少。为此, 本文采用冯北元介绍的 Na-K-ATPase 活力的微量测定方法^[5], 以敏感家蝇品系为试材, 研究其神经系统中 Na-K-ATPase 活力测定的最佳反应条件, 在此条件下, 测定了溴氰菊酯和氯菊酯对不同家蝇品系神经系统中 Na-K-ATPase 的抑制作用, 以明确家蝇 Na-K-ATPase 与拟除虫菊酯抗性的关系, 为延长拟除虫菊酯类农药的使用寿命, 延缓抗性的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 家蝇敏感品系 (SP): 引自美国 Texas A&M 大学昆虫系 Plapp 教授实验室, 未接触过任何杀虫剂; 抗氯菊酯品系 (2Cl-R): 1979 年由“南口”种群选育的, 室内用氯菊酯连续汰选; 抗溴氰菊酯品系 (Del-R): 1983 年采自养鸭场, 在室内用溴氰菊酯进行筛选培育。

* 国家自然科学基金资助项目

** 南京农业大学植保系, 210095

1997-09-16 收稿, 1998-01-06 收修改稿

杀虫剂及试剂: 氯菊酯 (Permethrin) 为上海联合化工厂产品, 纯度为 90%; 溴氰菊酯 (Deltamethrin) 为法国罗素·优克福公司产品, 纯度为 99%; PP'-DDT, 纯品。

ATP 钠盐, 德国; Ouabain: Fluka 产品; Ficoll: Pharmacia 产品; 考马斯亮兰: Fluka 产品; 其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 生物测定: 将羽化后 4~5 天的成虫, 用乙醚麻醉, 选取雌虫用点滴法测定。杀虫剂用丙酮稀释成系列浓度, 然后用微量点滴器蘸取药液, 点于家蝇的背板上, 24 h 后检查死虫数, 计算 LD_{50} 及 95% 置信限。

1.2.2 酶源制备: 参照 Feng 的方法^[6], 略有改进。将羽化后 4~5 天的家蝇取出, 于 -20°C 低温冰柜中冷冻 1 h, 过筛, 取头部称重, 加入 10 倍体积含 0.1 mol/L Tris、1 mmol/L EDTA、0.25 mol/L 蔗糖缓冲液 ($\text{pH}=7.4$), 研磨、匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 在 13 000 r/min 条件下, 离心 30 min, 取沉淀, 用 6 mL 0.25 mol/L 蔗糖缓冲液悬浮, 在 25 000 r/min、18% 和 4% (1:1) 的 Ficoll 蔗糖溶液中梯度离心 60 min, 取出 4%、18% 界面间的悬浮物, 按 1:3 比例加入 10 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.4$) 缓冲液, 15 000 r/min 离心 20 min, 沉淀物用 10 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.4$) 缓冲液悬浮并稀释至所需浓度, 作为酶源。所有操作均在 4°C 的条件下进行。

1.2.3 Na-K-ATPase 活力的测定: 参照冯北元方法进行^[5]。反应体积为 100 μL , 分 3 组, 每组反应体系中均含有 50 mmol/L Tris-HCl、含 6~10 μg 蛋白质的酶液、5 mmol/L MgCl_2 , 3 组不同之处为: I 组含有 150 mmol/L NaCl、20 mmol/L KCl; II 组含 0.5 mmol/L Ouabain。III 组为对照。在 37°C 水浴中预保温 5 min, 加底物 ATP (0.5 mmol/L), 于 37°C 水浴中反应 5 min, 加 50 μL 15% 三氯乙酸终止反应。按冯北元 (1981) 方法进行染色, 在 Beckman DU-600 分光光度计 625 nm 处测定 OD 值, 求出反应中生成无机磷的量, 以计算 ATPase 的活力。

1.2.4 杀虫剂对 Na-K-ATPase 的抑制作用: 杀虫剂用乙醇配成一定浓度的母液, 用无离子水稀释至所需浓度 (现配现用), 在反应体系中乙醇最后浓度不应超过 0.2%, 与酶液在 37°C 下预保温 5 min., 再加 ATP, ATPase 活力测定方法同上。以不加农药的酒精水溶液为对照。

1.2.5 蛋白质含量测定: 按 Bradford 法进行^[7]。

2 结果与分析

2.1 生物测定

三个家蝇品系对氯菊酯及溴氰菊酯的 LD_{50} 值和抗性倍数见表 1。结果表明, Del-R 和 2Cl-R 家蝇品系对溴氰菊酯和氯菊酯的抗性倍数分别为 100 280.00 倍和 11 262.50 倍, Del-R 品系对氯菊酯、2Cl-R 品系对溴氰菊酯存在着明显的交互抗性。

2.2 Na-K-ATPase 活力测定条件的研究

以敏感家蝇品系神经系统突触体为材料, 研究了 pH、温度和底物浓度对 ATPase 活力的影响。

表 1 不同家蝇品系对二种杀虫剂的 LD₅₀和抗性比

品系 Strain	溴氰菊酯 Deltamethrin		氯菊酯 Permethrin	
	LD ₅₀ [*] (95%置信限)	RR ^{**}	LD ₅₀ [*] (95%置信限)	RR ^{**}
SP	2.14×10 ⁴ (1.17~3.51×10 ⁴)	—	8.00×10 ⁴ (0.28~1.50×10 ³)	—
Del-R	21.4 (12.42~58.60)	100 280.00	6.17 (4.84~7.86)	7 712.50
2Cl-R	0.29 (0.09~0.81)	1 400.00	9.01 (6.92~11.28)	11 262.50

* μg/蝇; ** 抗性品系 LD₅₀/敏感品系 LD₅₀

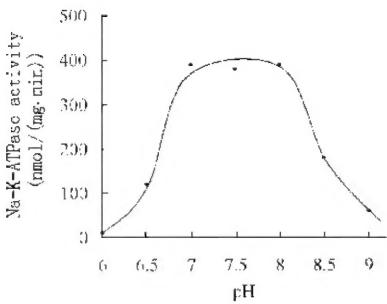


图 1 pH 对 Na-K-ATPase 活性的影响

Fig.1 Effect of pH on Na-K-ATPase activity

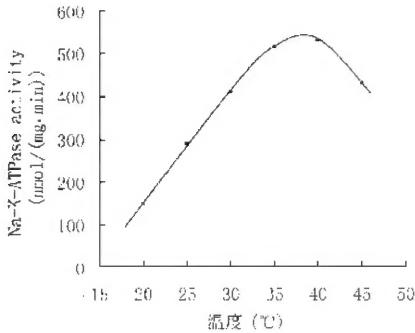


图 2 温度对 Na-K-ATPase 活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on Na-K-ATPase activity

2.2.1 pH 对 Na-K-ATPase 活力的影响：在 37℃ 时，测定了不同 pH 值条件下 Na-K-ATPase 活力（图 1），结果表明：pH 值对该酶活力影响较大，pH 值<6.5 或>8.5，酶活力显著下降。Na-K-ATPase 反应的适宜 pH 值在 7.0~8.0。

2.2.2 温度对 Na-K-ATPase 活力的影响：在反应体系的 pH 值为 7.4 时，测定了不同温度条件下 Na-K-ATPase 的活力（图 2），图中表明，在 20~40℃ 酶活力随反应温度的升高而增加，超过 40℃，酶活力下降。故反应温度控制在 35~40℃ 为宜。

2.2.3 底物浓度对 Na-K-ATPase 活力的影响：在温度为 37℃，pH 值为 7.4 的条件下，测定了不同浓度的底物对酶

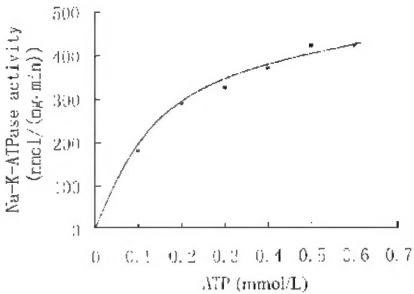


图 3 ATP 浓度对 Na-K-ATPase 活力的影响

Fig.3 Effect of ATP concentration on Na-K-ATPase activity

活力的影响作用（图 3）。ATP 浓度较低时，随着浓度的增加，Na-K-ATPase 活性呈线性关系上升，当 ATP 浓度达到一定值时，酶活性增长缓慢，曲线呈平稳状态。以 Lineweaver-Burk 曲线作图，求出 Na-K-ATPase 的 K_m 为 0.22 mmol/L， V_{max} 为 555.56 nmol/(mg·min)。故此，底物浓度应大于 0.44 mmol/L，但也不宜过高。因在 ATP 过量时，会抑制该酶的活性^[2]，经测定反应体系中最佳 ATP 浓度在 0.5mmol/L 为宜。

2.3 不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性及杀虫剂对 ATPase 活力的抑制作用

在 pH 值为 7.4，温度为 37℃ 条件下，测定了三个品系家蝇 Na-K-ATPase 的活性及溴氰菊酯和氯菊酯对 ATPase 活力的抑制作用。见表 2、表 3。

表 2 不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性
Table 2 Na-K-ATPase activity in three strains of housefly

品系 Strain	Na-K-ATPase 活力 (nmol/ (mg•min))	R/S
SP	412.82 (± 6.82)	1
Del-R	442.63 (± 44.26)	1.07
2Cl-R	442.16 (± 29.77)	1.07

注：5~8 次重复的平均值，表 3 同此

表 3 拟除虫菊酯对不同家蝇品系 Na-K-ATPase 活性的抑制
Table 3 Inhibition of pyrethroid on nerve Na-K-ATPase in three strains of housefly

品系 Strain	抑制率 (%)	
	溴氰菊酯 Deltamethrin	氯菊酯 Permethrin
SP	14.73 (± 4.35)	17.83 (± 3.72)
Del-R	3.13 (± 0.98)	-5.01 (± 1.52)
2Cl-R	-1.74 (± 0.72)	0.49 (± 1.63)

结果表明，敏感和两种不同抗性家蝇品系之间 Na-K-ATPase 活性无明显差异。在相同浓度下 (10⁻⁴ mol/L)，溴氰菊酯、氯菊酯对 SP 品系 Na-K-ATPase 抑制率分别为 14.73% 和 17.83%，而对 2Cl-R、Del-R 品系抑制率很低，甚至不抑制，且氯菊酯对 Del-R 品系的 Na-K-ATPase 存有一定的刺激作用。由此表明，抗性家蝇品系 Na-K-ATPase 对杀虫剂的敏感性已明显降低。

3 讨论

正常情况下，神经细胞膜内外 Na⁺、K⁺ 分布差异很大，细胞内呈高 K⁺ 低 Na⁺，膜外为高 Na⁺ 低 K⁺。这是保证神经冲动传导的必要条件之一。Na-K-ATPase 可水解 ATP 的高能磷酸键以释放出自由能，逆着离子浓度差，主动把膜内的 Na⁺ 转移到膜外，把膜外的 K⁺ 移入膜内，以保持膜两侧 Na⁺、K⁺ 的浓度差，确保正常的神经冲动的传导^[8]。当 Na-K-ATPase 活性被抑制后，使 Na⁺ 不能泵出，造成神经膜处于持续兴奋状态，继而导致神经系统功能紊乱，最终使昆虫死亡。宁黔冀^[4]测定了拟除虫菊酯不同异构体对美洲大蠊中枢神经系统 Na-K-ATPase 活力的影响，结果表明：10⁻⁴ mol/L 氯氰菊酯顺、反式异构体对 Na-K-ATPase 活力的抑制率达 58.8% 及 55.1%，高效体为 27.1%。Leng 报道^[9]，溴氰菊酯在 10⁻⁷ mol/L 与 10⁻³ mol/L 之间可抑制家蝇脑突触体 Na-K-ATPase 与 Mg-ATPase 的活力。我们的实验结果 (10⁻⁴ mol/L 溴氰菊酯、氯菊酯对敏感家蝇神经系统的 Na-K-ATPase 活性有明显的抑制作用) 与之相符。从而说明，神经系统中的 Na-K-ATPase 可能是拟除虫菊酯类杀虫剂的重要靶标之一。

昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性机理主要包括：昆虫表皮对杀虫剂穿透速率的降低、

解毒代谢的增强以及靶标部位敏感性的降低^[10,11]。Farnham^[12,13]、Plapp^[14]、Chang^[15]等认为家蝇对拟除虫菊酯的主要抗性机制是击倒抗性(kdr),并证明它们位于家蝇第三染色体上,是一个隐性基因。冯国蕾等^[16]通过毒力、抗击倒效应、杂交等试验,证明Del-R、2Cl-R品系也存在kdr抗性机制。kdr抗性的确切机制目前还不太清楚,Miller和Osborne报道^[17,18],kdr与拟除虫菊酯对神经敏感性降低有关。赵文柱^[19]用电生理的方法,测定了本室Del-R品系家蝇中枢神经系统对溴氰菊酯、二氯苯醚菊酯的敏感性分别下降了1 010倍和1 833倍。但是引起神经敏感性降低的分子机制知道的甚少,而目前对此的研究也主要集中于三个方面:(1)神经膜磷脂双分子层的变异;(2)钠离子通道数量的变化;(3)钠离子通道的质变^[20]。李宏报道^[1],Na-K-ATPase不仅可水解ATP、主动运输Na⁺、K⁺,而且在无ATP供给能量时,还具有Na⁺、K⁺等离子通道的功能。由此可见,Na⁺通道与Na-K-ATPase密切相关。张宗炳、宁黔冀等报道^[21,4],昆虫神经系统的Na-K-ATPase是拟除虫菊酯类杀虫剂的靶标位点之一。本文研究结果表明:三个家蝇品系的Na-K-ATPase活性无明显差异,依照唐振华^[22]的观点,说明抗拟除虫菊酯品系家蝇神经系统中Na⁺通道数量没有减少。但拟除虫菊酯对不同品系家蝇Na-K-ATPase的抑制作用存在着较大的差别,药剂能抑制敏感品系家蝇Na-K-ATPase的活性,而对抗性品系无抑制作用,说明在抗性品系中,Na-K-ATPase对拟除虫菊酯的敏感性有很大的降低,这也可能是kdr抗性的机制之一。在拟除虫菊酯抗性家蝇中Na-K-ATPase对杀虫剂的敏感性降低,是否是Na-K-ATPase的结构发生了变异,还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- 1 李 宏, ATPase的研究进展, 生物学杂志, 1996, (3): 9~12
- 2 祁 鸣, Na-K-ATPase的特性研究及其应用, 生物化学与生物物理进展, 1986, (3): 22~26
- 3 Skou J C. The Na-K-ATPase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1992, 24 (3): 249~261
- 4 宁黔冀, 尚稚珍. 昆虫ATPase活性的测定与应用, 中国有害生物综合治理论文集, 北京: 中国农业出版社, 1996, 1 068~1 071
- 5 冯北元. 大鼠脑突触体Na-K-ATPase活力的微量测定方法, 生物化学与生物物理进展, 1981, (2): 48~49
- 6 Feng G L, Jacques R M, Clark J M. Suppression of pyrethroid-dependent neurotransmitter release from synaptosomes of knockdown-resistant house flies under pulsed-depolarization condition during continuous perfusion. Pestic. Biochem. Physiol., 1992, 42 (1): 64~77
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~254
- 8 王伯扬. 神经电生理学, 北京: 高等教育出版社, 1982
- 9 Leng X F. Effect of deltamethrin on protein phosphorylation of housefly brain synaptosome. Pestic. Sci., 1995, 44: 88~89
- 10 翟启慧. 昆虫分子生物学的一些进展: 杀虫剂抗性的分子基础. 昆虫学报, 1995, 38 (4): 493~501
- 11 孙耘芹, 袁家蟪, 李 晶. 家蝇对拟除虫菊酯农药的抗性机制. 昆虫学报, 1990, 33 (3): 265~272
- 12 Farnham A W. Genetics of resistance of pyrethroid-selected houseflies (*Musca domestica* L.). Pestic. Sci., 1973, 4 (4): 513~520
- 13 Farnham A W. Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroid. I. knockdown resistance. Pestic. Sci., 1977, 8 (5): 631~636
- 14 Plapp F W, Browning C R, Peter J H. Analysis of rate development of insecticide resistance based on simulation of a genetic

- model. Environ. Entomol., 1979, 8 (3): 494~499
- 15 Chang C P, Plapp F W. DDT and pyrethroids: receptor binding in relation to knockdown resistance (kdr) in the housefly. Pestic. Biochem. Physiol., 1983, 20: 86~91
 - 16 冯国蕾, 何凤琴, 李 梅等. 神经递质释放与家蝇对拟除虫菊酯抗性关系研究. 昆虫学报, 1997, 40 (1): 15~22
 - 17 Miller T A, Kennedy J, Collins C. CNS insensitivity to pyrethroid in the resistant kdr strain of houseflies. Pestic. Biochem. Physiol., 1979, 12: 224
 - 18 Osborne M P, Hart R J. Neurophysiological studies of the effects of permethrin upon pyrethroid resistant (kdr) and susceptible strains of dipteran larvae. Pestic. Sci., 1979, 10: 407~413
 - 19 赵文柱, 冯国蕾, 赵 勇等. 家蝇对 DDT 和拟除虫菊酯的重要抗性机制——中枢神经系统的不敏感性. 昆虫学报, 1992, 35 (4): 393~398
 - 20 Lund A E. Pyrethroid modification of the sodium channel: current conception. Pestic. Biochem. Physiol., 1984, 22: 161~168
 - 21 张宗炳. 昆虫毒理学的新进展. 北京: 北京大学出版社, 1982, 7~8
 - 22 唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 农业出版社, 1993, 332

INHIBITION OF PYRETHROID INSECTICIDES ON NERVE NA-K-ATPASE IN HOUSE FLIES (*MUSCA DOMESTICA*)

He Yunzhan Li Mei Feng Guolei Wang Yinchang

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The properties of Na-K-ATPase in the nerve system of house flies were described. For Na-K-ATPase the optimum pH and temperature were 7.0~8.0 and 35~40°C respectively, the K_m value was 0.22 mmol/L ATP and V_{max} was approximately 555.56 nmol Pi/ (mg•protein•min). The Na-K-ATPase activities in susceptible (SP) and Del-R, 2Cl-R house fly strains were determined. The results indicated that there was no significant difference in Na-K-ATPase activities among the three strains. Inhibition of deltamethrin and permethrin on Na-K-ATPase activity was also studied. The results showed that the two pyrethroids inhibited obviously the Na-K-ATPase activity in the susceptible strain, but no effect in the resistant strain.

Key words Na-K-ATPase, house fly, pyrethroid